

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-165243

(43) 公開日 平成8年(1996)6月25日

| (51) Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|-----------------------------|------|-----------|-----|--------|
| A 6 1 K 31/70 | | | | |
| 31/73 | ABE | | | |
| // C 0 7 H 3/06 | | | | |
| 11/00 | | | | |
| C 0 8 B 37/08 | | A 7433-4C | | |
| 審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 5 頁) | | | | |

(21) 出願番号 特願平6-332021

(22) 出願日 平成6年(1994)12月12日

(71) 出願人 390033145

焼津水産化学工業株式会社

静岡県焼津市小川新町5-8-13

(72) 発明者 鈴木 康夫

静岡県静岡市瀬名200-16

(72) 発明者 宮坂 昌之

埼玉県浦和市三室636-104

(72) 発明者 ピーター アラン ワード

アメリカ合衆国 ミシガン州 アンアーバ

ー ウォルナットウッズ4900

(74) 代理人 弁理士 松井 茂

(54) 【発明の名称】 抗炎症剤

(57) 【要約】

【目的】 近年明らかになりつつある、炎症の誘発機作に基いて、副作用がほとんどなく、十分な抗炎症作用を有し、製造が容易な抗炎症剤を提供する。

【構成】 硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を有効成分として含有させて抗炎症剤とする。近年、炎症は、白血球上、及び血管内皮細胞上に特定の接着分子が存在し、それらの接着分子の相互作用により白血球と血管内皮細胞とが接着して、炎症局所へ白血球の浸潤が開始されることにより誘発されることが明らかになってきた。硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩は、その特定の接着分子であるセレクチンのリガンドとして作用して、白血球と血管内皮細胞との接着を阻害することにより、炎症を阻害する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする抗炎症剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新しい作用機作に基いて炎症性疾患を治療する抗炎症剤に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、肺炎、肝炎、腎炎等の炎症性疾患の治療薬としては、副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド又は各種の非ステロイド系抗炎症剤が用いられていた。これらは、例えばホスホリパーゼA2 阻害、リポキシゲナーゼ阻害、シクロオキシゲナーゼ阻害等の抗プロスタグランジン作用に基づいて開発されたものであって、炎症反応を抑制または遮断し、炎症による合併症を防ぐ目的で使用されていた。

【0003】一方、近年、炎症の誘発は、白血球と血管内皮細胞間の接着を促進する分子に起因し、この反応には特定の接着分子が深く関与することが明らかとなってきた。すなわち、白血球上、及び炎症部位から遊離されるインターロイキン1やTNF（腫瘍壊死因子）により活性化された活性化血管内皮細胞上に、それぞれ特定の接着分子が存在し、それらの接着分子の相互作用により、白血球、特に好中球と、血管内皮細胞とが接着して、炎症局所へ、白血球の浸潤が開始されることが明らかとなってきた。

【0004】これらの接着分子は、白血球及び血管内皮細胞の双方から発現されるが、セレクトインファミリー、インテグリンファミリーが代表的なものである。なお、セレクトインファミリーは、白血球が血管内皮細胞へ結合する初期段階に接着を起こさせ、インテグリンファミリーは、主としてその後起こるよりしっかりした結合に関わる。

【0005】これらのうち、セレクトインファミリーは、糖鎖をそのリガンドとすることが明らかとなってきた。セレクトインファミリーには血管内皮細胞に存在するE-セレクトイン(Bevilacqua, M.P. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 9238-9243)、活性化血小板に発現されるP-セレクトイン(Geng, J.G. et al. (1990) Nature, 343, 757-760)、白血球に存在するL-セレクトイン(Ley, K. et al. (1991) Blood, 77, 2553-2555)の3種が存在するが、これらの糖鎖リガンドは、シアリルLe^xあるいはシアリルLe^a(Lowe, J.B. et al. (1991) cELL, 53, 475-484; Philipis, et. al. (1990) Science, 250, 1130-1132; Magnani, J.L. (1991) Glycobiology, 1, 318-320)であると同定されている。

【0006】そこで、近年明らかになりつつある炎症の誘発機作に関する知見を基に、白血球の血管内皮細胞からの浸潤を阻害することにより、炎症を抑制することが考えられる。すなわち、白血球と血管内皮細胞とのセ

クチンを介した接着を阻害するために、セレクトインのリガンドであるシアリルLe^x やシアリルLe^a を直接体内へ投与して炎症を抑制しようとする試みがなされている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、グルココルチコイドは強い抗炎症作用を示すものの、若年層に投薬すると、満月様顔貌、めまい、頭痛、嘔吐など、更に重篤な場合には感染症、消化管出血、代謝異常、骨粗症、血栓症の誘発などの副作用を伴うために連続投与は困難であるという問題があった。

【0008】また、非ステロイド系抗炎症剤は一般的に効力が弱いという問題があった。

【0009】更に、セレクトインのリガンドであるシアリルLe^x やシアリルLe^a を直接体内へ投与する方法は、その問題点は明らかでないが、未だ認可されていない。なお、シアリルLe^x は、シアル酸転移酵素を用いて酵素的に合成されるが、合成が困難である。また、シアリルLe^x は、主にE-セレクトインと結合し、L-セレクトインやP-セレクトインとはあまり強く結合しない。

【0010】本発明は上記問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、副作用がほとんどなく、十分な抗炎症作用を有し、製造が容易な抗炎症剤を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意研究し、ラットに、コブラ毒(Cobra venom factor, 以下CVFと略記)を静脈内投与することにより惹起される、好中球依存性及び酸素ラジカル介在性で、かつ、P-セレクトイン及び／又はL-セレクトイン依存性の炎症モデルにおいて、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩が、肺の血管透過性の増大、炎症に伴う出血及びミエトペルオキシダーゼ(MPO)活性を有為に抑制することから、抗炎症剤として有用であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

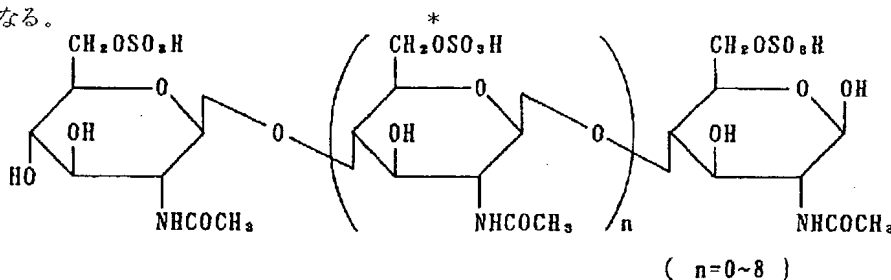
【0012】すなわち、本発明の抗炎症剤は、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする。

【0013】以下、本発明について好ましい態様を挙げて詳細に説明する。

【0014】本発明において硫酸化キチンオリゴ糖は、キチンオリゴ糖を化学的に硫酸化して得られるものを用いるのが好ましい。キチンオリゴ糖は、カニ、エビ等の甲殻類の外皮から得られる天然多糖類であるキチンを、酸、アルカリ等で化学的に部分加水分解するか、微生物・酵素等により生物化学的に部分加水分解して得られるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)のオリゴマーである。また、キチンオリゴ糖の重合度は、2~10程度で、多糖であるキチンに比べて水に対する溶解性が高い。キチンオリゴ糖は良質の甘味を有することから、食品素材として従来より使用されており、したがって、人体に対

する安全性は高いものであるといえる。

【0015】キチンオリゴ糖の硫酸化は、通常、一般的に行われている方法を採用することができるが、硫酸化剤として、硫酸・トリメチルアミン複合体を使用するのが好ましい。キチンオリゴ糖と硫酸化剤の使用割合は、目的とする硫酸化キチンオリゴ糖の硫酸化率（又は硫酸含有率）及び反応条件に応じて選ぶことができる。例えば、50～60℃の温度下に、数十時間～数日間にわたって反応させる場合には、キチンオリゴ糖の重量の2倍量の硫酸化剤を用いるのが好ましい。このような条件下に製造する場合、硫酸化率は、キチンオリゴ糖の総水酸基の約50～60%となる。



【0019】なお、本発明で用いる硫酸化キチンオリゴ糖は、キトサンオリゴ糖を同様の処理により硫酸化することによっても製造することができる。

【0020】また、本発明において硫酸化キチンオリゴ糖の塩は、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、二価鉄塩等を用いることができる。

【0021】本発明の抗炎症剤は、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を抗炎症物質として含有していればよく、その形態は、粉剤、錠剤、カプセル剤等の経口投与剤、軟膏、スプレー剤等の外用薬、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、皮内等への注射剤等いずれであってもよく、その形態に応じて、通常の医薬品の調製に使用される希釈剤、賦形剤等を配合するのが好ましい。なお、希釈剤、賦形剤は製造しようとする医薬品の形態に応じて、粉剤、溶剤、懸濁剤等が用いられるが、これらは、具体的には、例えば、粉剤としては、乳糖、セルロース等が用いられ、溶剤としては、水、エチルアルコール、プロピレングリコール等が用いられ、懸濁剤としては、ポリオキシエチレンソルビトール、ソルビタンエステル類等が用いられる。

【0022】本発明の抗炎症剤の成人1人当たりの投与量は、硫酸化キチンオリゴ糖として、経口の場合0.1～1.0 g、静脈内の場合10～100 mg、筋肉内の場合50～300 mg、皮下、皮内の場合30～150 mgを、1日1回又は数回に分割して投与するのが好ましい。また、外用薬としては、例えば、軟膏として外皮局所に塗布し、又はスプレー剤の形で外皮、咽喉、鼻腔等に適用し、あるいは点眼液として使用することができる。この場合、外用剤中の硫酸化キチンオリゴ糖の濃度は、剤形や適用部位によって異なるが、0.1～1重量%とするのが好ましい。 ※50

*【0016】また、硫酸化キチンオリゴ糖の精製は、通常、各種の修飾多糖類を精製する際に採用されている方法により行うことができる。具体的には、反応混合物を減圧濃縮後、蒸留水に対して透析することにより脱塩し、トリフルオロ酢酸処理によりトリメチルアミンを除去し、次いで凍結乾燥することにより、白色粉末を得ることができる。

【0017】硫酸化キチンオリゴ糖の一般式を化1に示す。

【0018】

【化1】

※【0023】

【作用】本発明の抗炎症剤は、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を有効成分として含有するが、ラットに、CVFを静脈内投与することにより惹起される、好中球依存性及び酸素ラジカル介在性で、かつ、P-セレクトリン及び／又はL-セレクトリン依存性の炎症モデルに、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩を投与すると、肺の血管透過性の増大、炎症に伴う出血及びミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を有意に抑制することから、優れた抗炎症作用を有するものであるといえる。

【0024】これは、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩が、セレクトリンのリガンドとして作用し、炎症の誘発となる白血球と血管内皮細胞とのセレクトリンを介した接着を阻害するためと考えられる。

【0025】すなわち、上記実験動物モデルを用いてスクリーニングされる物質は、セレクトリンが介在する白血球の血管内皮細胞への接着による組織浸潤を抑制するので、広く炎症一般、例えば成人呼吸気道症候群(adult respiratory distress syndrome: ARDS)等の予防または治療に有効であると期待され、したがって、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩は、種々の炎症に対して有効であることが期待される。

【0026】また、キチンオリゴ糖は良質の甘味を有することから、食品素材として従来より使用されており、したがって、人体に対する安全性は高いものであるといえる。

【0027】更に、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩は、安価に、大量生産することが可能であり、経済的にも有利である。

【0028】

【実施例】以下に、本発明の抗炎症剤の有効成分である硫酸化キチンオリゴ糖の効果を明らかにするため、実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】実施例1

キチンオリゴ糖であるキトテトラオース ($[\text{GlcNAc}]_4$) 200 mgと、硫酸・トリメチルアミン複合体 (アルドリッチ社製) 400 mgとを、ジメチルホルムアミド 6 ml に溶解し、50~60℃の油浴中で、1週間攪拌した。

【0030】得られた反応液を真空ポンプで減圧濃縮した後、残渣を水に溶解し、脱イオン水に対して15時間透析し、次いで凍結乾燥した。得られた乾固物を、水 2 ml に溶解し、キトテトラオースの水酸基総数の1.5倍モル相当量のトリフルオロ酢酸を加えて、室温下に、1時間攪拌した。続いて、反応液を透析した後、凍結乾燥して、硫酸化率 (硫酸含有率) が7.2%の硫酸化キチンオリゴ糖 ($[\text{GlcNAc}]_4\text{-SO}_3\text{H}$) 190 mgを得た。

【0031】実施例2

実施例1において、キチンオリゴ糖であるキトテトラオースを、キトペンタオース ($[\text{GlcNAc}]_5$) に代え、あとは実施例1と同様にして、硫酸化率 (硫酸含有率) が13.5%の硫酸化キチンオリゴ糖 ($[\text{GlcNAc}]_5\text{-SO}_3\text{H}$) 200 mgを得た。

【0032】試験例 (抗炎症作用の評価試験)

(1) 肺炎症の評価法及び肺炎症モデル動物の作成

実施例1、2で得られた $[\text{GlcNAc}]_4\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $[\text{GlcNAc}]_5\text{-SO}_3\text{H}$ の2種の硫酸化キチンオリゴ糖の抗炎症作用を評価するために、硫酸化する前の $[\text{GlcNAc}]_4$ と、 $[\text{GlcNAc}]_5$ とを、それぞれ比較例1、比較例2として用いた。これらを被検物質とする。

【0033】それぞれの被検物質を、1 mg/kg 濃度で、1 mgウシ血清アルブミン/ml生理食塩水溶液に溶かし、1分間超音波処理して、被検物質溶液とした。

【0034】また、コブラ (*Naja naja*) 粗毒素から、Tilleyらの方法 (J. Clin. Invest., 69, 1126-1135 (1982)) により、CVFを精製単離した。

【0035】ラット (雄性、Long Evans、250-350g) に、被検物質溶液を、0.3 ml/匹静脈内投与した後、体重1 kg当たり20 UのCVFを、 ^{125}I -ウシ血清アルブミン ($0.5 \mu\text{Ci}$) 及び ^{51}Cr 標識ラット赤血球とともに静脈内投与した。なお、ラットは、CVFの投与により肺炎症をおこす。

【0036】CVFを投与してから30分間経過後に、ラットを、体重1 kg当たり100 mgの塩酸ケタミンで麻酔して殺し、背部大動脈から採血した。

【0037】その後、30分間隔で、肺の血管系を、右心

室を介して、pH7.4のリン酸緩衝液10 mlを用いて灌流した。次いで、肺を摘出し、滅菌生理食塩水10 mlで、上記血管系を灌流し、次いで、組織内に残存する放射能量を、ガンマシンチレーションカウンターで測定した。

【0038】なお、陽性対照ラットは、被検物質を投与せず、あとは上記と同様に処理し、陰性対照ラットは、被検物質を投与せず、CVFの代わりにpH7.4のリン酸緩衝液を使用した以外上記と同様に処理した。

【0039】肺の炎症を、肺の血管透過性の増大と出血によって測定した。血管透過性の増大は、殺した時に得た静脈の血液1 ml中に存在する放射能量に対する肺組織内に存在する ^{125}I -ウシ血清アルブミン放射能量の比を求めることにより測定した。また、出血は、殺した時に得た静脈の血液1 ml中に存在する放射能量に対する肺組織内に存在する ^{51}Cr 標識ラット赤血球の放射能により測定した。

【0040】それぞれ、被検物質及びCVF投与ラットの測定値を被検物質値、陽性対照ラットの測定値を陽性対照値、陰性対照ラットの測定値を陰性対照値として、肺炎症の阻害活性を下記の数1により算出した。

【0041】

【数1】肺炎症の阻害活性 (%) = $100 \times \{ (\text{被検物質値} - \text{陰性対照値}) / (\text{陽性対照値} - \text{陰性対照値}) \}$

【0042】(2) 好中球浸潤の指標としての組織ミエロペルオキシダーゼ (以下MPOと略記) 活性の測定法 炎症反応のもう一つの指標として好中球の血管から組織への浸潤を調べた。好中球にはマーカー酵素としてMPO活性が存在する。そこで、好中球浸潤の指標としてのMPO活性を測定した。

【0043】グリコーゲン刺激ラットの一定数の腹腔内好中球を正常ラットの肺に加え、組織をホモゲナイズし、次いで抽出した後、検量線を作成した (Warrenら、J. Clin. Invest., 84, 1873-1882, 1989)。

【0044】上記(1)で得られた肺標品を、緩衝液 (50 mMリン酸塩、pH6.0) 6 mlを用い、ホモゲナイザーとして「Polytron」 (Tokmar Co., 製、ダイアル4に設定) を使用して、40秒間ホモゲナイズした。次いで、4℃、3000xgの条件下で、30分間遠心分離した後、上澄液中のMPO活性を、0-ジアニジン存在下で、 H_2O_2 の消費からもたらされる460 nmの吸光度の変化を測定することにより評価した。

【0045】(3) 結果

肺の血管透過性の増大、出血、MPO活性の測定結果を表1に示す。

【0046】

【表1】

| | 被検物質 (1 mg/kg 静注) | 肺炎症の阻害活性 (%) | | |
|-------|--|--------------|------------|-----------|
| | | 透過性 | 出血 | MPO |
| 実施例 1 | [GlcNAc] ₄ -SO ₃ H | 28(<.05) | 31(<.05) | 40(<.02) |
| 比較例 1 | [GlcNAc] ₄ | 2.2(N.S.) | 0(N.S.) | -2(N.S.) |
| 実施例 2 | [GlcNAc] ₅ -SO ₃ H | 37(<.05) | 38(<.05) | 20(<.042) |
| 比較例 2 | [GlcNAc] ₅ | -4.5(N.S.) | -6.6(N.S.) | -2(N.S.) |

(表1中、括弧内の<はp値を示し、N.S.は有意差なしを意味する。)

【0047】表1の結果から、実施例1、2の硫酸化キチンオリゴ糖は、比較例1、2の硫酸化しないキチンオリゴ糖と比較して、コブラ毒(CVF)の投与による肺炎症において、肺の血管透過性の増大、炎症に伴う出血及びミエトペルオキシダーゼ(MPO)を有意に阻害することがわかる。したがって、実施例1、2の硫酸化キチンオリゴ糖は、抗炎症剤として利用できることがわかる。

【0048】(4)急性毒性の試験結果

実施例1、2で得られた硫酸化キチンオリゴ糖について、ラットにおける急性毒性を試験した。

【0049】その結果、LD₅₀>5g/kgであった。したがって、硫酸化キチンオリゴ糖は安全性が高いといえる。

*

*【0050】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の抗炎症剤によれば、有効成分として含有する硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩が、セレクトインのリガンドとして作用することにより、炎症の誘因である白血球と血管内皮細胞とのセレクトインを介した接着を阻害し、炎症性疾患を治療することができる。したがって、従来の抗炎症剤とは全く異なる作用機序による抗炎症剤であるといえ

る。なお、キチンオリゴ糖は、食品素材として従来より使用されており、したがって、人体に対する安全性は高く、副作用もない。また、硫酸化キチンオリゴ糖及び／又はその塩は、安価に、容易に大量生産することができ、経済的にも有利である。